论著

文章编号:1000-5404(2006)10-1060-03

# 成年大鼠肌源性干细胞的培养和鉴定

叶 锦,靳风烁,陈 锦,梁培禾,张克勤 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所泌尿外科,重庆 400042)

**提 要:目的** 探讨成年大鼠肌源性干细胞分离及纯化方法。**方法** 采用消化法分离肌源性干细胞,然后用密度梯度离心法和差速贴壁法纯化干细胞;结蛋白(desmin)、CD34、CD45、Sca-1免疫细胞化学染色对细胞进行鉴定。**结果** 成功培养出高纯度的肌源性干细胞,免疫细胞化学染色结果为desmin(+),CD34(+),CD45(-),Sca-1(+)。**结论** 可通过体外原代培养获得高纯度肌源性干细胞,为组织工程的临床应用提供种子细胞。

**关键词**:肌源性干细胞;培养;鉴定

**中图法分类号**:R322.74;R329-33;R329.2 **文献标识码**:A

# Culture and identification of muscle-derived stem cells from adult rat

YE Jin, JIN Feng-shuo, CHEN Jin, LIANG Pei-he, ZHANG Ke-qin (Department of Urinary Surgery, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

**Abstract**: **Objective** To investigate the method of isolating and purifying skeletal muscle-derived stem cells (MDSCs) from adult rat. **Methods** The MDSCs from mature female SD rats were isolated by enzyme digestion and the cells were purified with Percoll density gradient centrifugation and differentially adherent culture technique. MDSCs were identified by desmin, CD34, CD45, and Sca-1 immunocytochemistry. **Results** Highly purified MDSCs were harvested and they showed desmin(+), CD34(+), CD45(-), Sca-1(+) by immunocytochemistry. **Conclusion** MDSCs can be cultured *in vitro* and used to tissue engineering as "seed" cells.

**Key words**: muscle derived stem cell; culture; identification

肌源性干细胞(muscle derived stem cells, MDSCs)属于成体多能干细胞,具有多细胞系分化和自我更新能力。通过诱导刺激,MDSCs可以分化为脂肪、骨骼、软骨、平滑肌和神经细胞等多种细胞和组织类型。作为基因治疗和组织工程的供体细胞,MDSCs已成为治疗心肌梗死、Duchenne肌营养不良(DMD)等疾病的研究热点[1-3]。本研究经过技术改良,通过体外原代培养获得高纯度MDSCs,为组织工程的临床应用打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

Ⅺ型胶原酶,多聚赖氨酸(Sigma公司);Dispase(grade Ⅱ)(Gibco公司);胰酶(Hyclone公司);DMEM培养液(Hyclone公司);胎牛血清(杭州赛乐公司);马血清(Hyclone公司);鸡胚提取液(自制);Percoll分离液(Amersham Biosciences公司);兔抗大鼠CD34、CD45、Sca-1抗体(PharMingen公司);Cy3和FITC荧光素标记二抗购自武汉博士德公司;小鼠抗大鼠desmin、skeletal myosin(fast)抗体,SABC试剂盒及DAB试剂盒购于武汉博士德公司。

### 1.2 骨骼肌细胞的消化分离

选取4~6周龄雌性SD大鼠10只,购自大坪医院野战外科研究所实验动物中心,体质量200~250 g,1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉(50 mg/kg)。无菌条件下取腓肠肌,D-Hanks液冲洗后,显微镜下尽可能剔除脂肪、肌腱、神经和血管。称重后用将肌组织剪成碎块(<1mm$^3$),移入离心管中。D-Hanks液吹打漂洗3次并静置1min,离心后弃去上层液及漂浮组织。加入0.2% Ⅺ型胶原酶,37 ℃消化1 h,离心后去上清液;加入dispase(2.4 U/ml),37 ℃孵育1 h,离心后去上清液;加入0.1%胰酶,37 ℃消化30 min,血清中止消化离心后去上清液。生长培养基(DMEM+20% FBS+10%马血清+0.5%鸡胚提取液+1%青/链霉素)重悬细胞,反复吹打后滤过100、200、400目细胞筛网,收集滤液800×$g$离心5 min,弃上清液,细胞团块用2 ml生长培养基重悬。

### 1.3 MDSCs的纯化培养

采用密度梯度离心法和preplate差速贴壁法[4]进行细胞纯

作者简介:叶 锦(1975-),男,湖南省湘潭市人,硕士,医师,主要从事泌尿生殖系统肿瘤和泌尿系统创伤的研究。电话(023)68757344

通讯作者:靳风烁,电话(023)68757364

收稿日期:2006-02-17;修回日期:2006-03-24

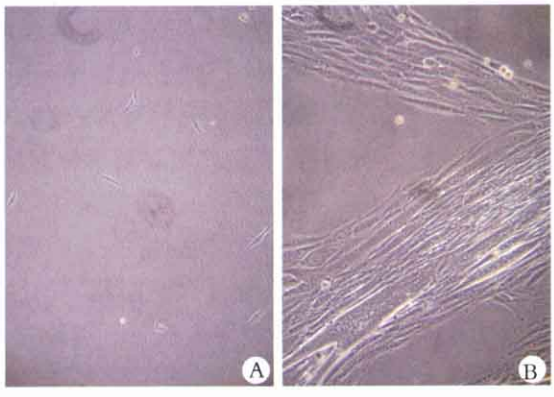
化，去除杂质细胞的污染。在离心管中加入 60% Percoll 2 ml，20% Percoll 2 ml，缓慢加入消化后的细胞悬液2 ml，800 × *g* 离心 20 min，收集 60% 与 20% Percoll 分界面处的细胞，无血清培养基漂洗后记数，将细胞接种于多聚赖氨酸包被的培养瓶中培养 1 h，贴壁细胞为 pp1；未贴壁细胞悬液转瓶培养 2 h，贴壁的细胞为 pp2；未贴壁细胞悬液再转瓶培养 18 h，贴壁的细胞为 pp3；未贴壁细胞悬液转瓶培养 24 h，贴壁的细胞为 pp4。以后间隔 24 h 转瓶培养至 pp6。pp6 培养 3 d 后换液，以后每天换液 1 次，倒置显微镜下观察，待细胞生长至 70% 融合后传代培养。

### 1.4　MDSCs 的鉴定

第 2 代细胞以 $1 \times 10^5$/孔接种于预置盖玻片的 12 孔培养板中，细胞贴片后制作细胞爬片，行 desmin、CD34、CD45、Sca-1 抗体免疫细胞化学染色；其中 CD34、CD45 二抗为 Cy3 标记，Sca-1 二抗为 FITC 标记，荧光显微镜下观察。其余细胞分裂增殖至 80% 融合后，改用分化培养基（DMEM + 2% FBS + 1% 青/链霉素）培养，待肌管形成后，行 skeletal myosin（fast）抗体免疫细胞化学染色鉴定。

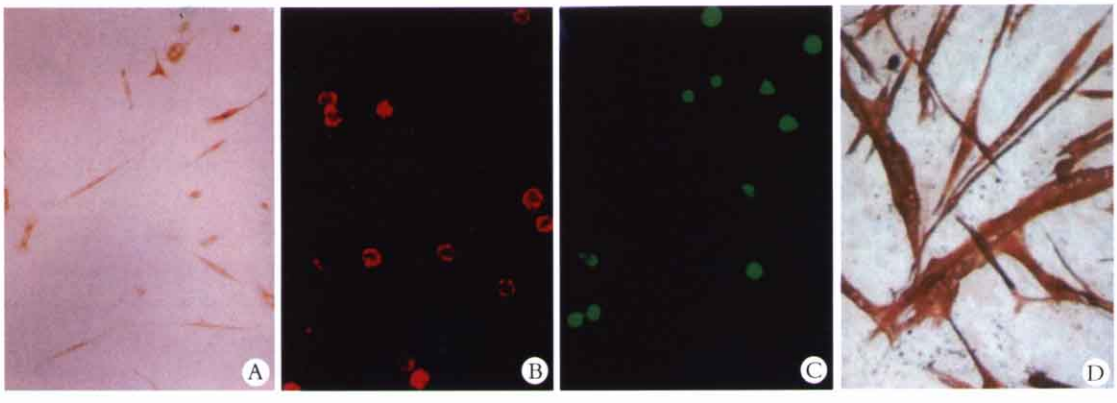
## 2　结果

骨骼肌消化分离获得的细胞悬液含有肌细胞、成纤维细胞、内皮细胞、血液细胞等多种细胞成分。采用密度梯度离心法处理细胞悬液后，血液细胞已经基本消除。针对各种细胞成分贴壁速度的差异，采用 preplate 差速贴壁技术可以成功分离出高纯度的 MDSCs。倒置显微镜下观察，pp1-pp4 细胞以成纤维细胞为主，形态扁平，多突起，贴壁迅速，数量多，生长迅速。pp4 以后的细胞数量明显减少，体积较小，贴壁缓慢，折光性强，多呈梭形或纺锤形（图 1A），增殖缓慢；随时间延长，单核细胞增殖呈细长梭形，相互融合并逐渐规律性地沿一个方向平行排列，分化培养后形成多核的肌管（图 1B）。经免疫细胞化学染色，MDSCs 呈 desmin（+），CD34（+），Sca-1（+），CD45（−）（图 2A − C）；MDSCs 分化培养后可融合形成多核肌管，skeletal myosin（fast）抗体免疫组织化学染色为强阳性（图 2D）。




A：肌源性细胞（倒置显微镜 × 100）；B：肌管（倒置显微镜 × 400）

**图 1　肌源性干细胞及其融合形成的肌管**




A：desmin（SABC × 200）；B：anti-CD34（Cy3 × 400）；C：anti-Sca-1（FITC × 400）；D：肌管 anti-skeletal myosin（fast）（SABC × 400）

**图 2　肌源性干细胞免疫细胞化学染色**

## 3　讨论

MDSCs 位于骨骼肌肌纤维膜外，属于多能干细胞，具有多细胞系分化和自我更新能力。近 10 年来才对 MDSCs 的生物学特性和功能有了较深入的了解[5]。之前研究较多的是 Mauro[6] 1961 年首先发现并定义的肌卫星细胞。卫星细胞是肌源性前体细胞，可以使肌肉再生并具有自我更新能力，它们属于肌原性谱系。MDSCs 是从骨骼肌分离的没有肌源性限制的多能干细胞，是卫星细胞的祖细胞，它不属于肌源谱系，也不属于间充质组织。一般认为，在无诱导因素作用下，MDSCs 定向分化为肌细胞和肌组织。研究表明，多能 MDSCs 可以分化为其他中胚层细胞类型。通过冻融技术从鸟类和哺乳动物骨骼肌组织中分离出的 MDSCs 通过糖皮质激素刺激后可以分化为肌肉、脂肪、骨骼和软骨[7-10]。将 MDSCs 移植到接受致命剂量照射的鼠身上，证实可以重组造血系统[11]。近来研究证实，MDSCs 甚至可以分化为平滑肌或神经细胞[12,13]。

MDSCs 在基因治疗和组织工程研究中具有广阔的应用前景。

相对于研究较多的心肌细胞而言[14,15]现有关于 MDSCs 的研究多在幼龄小鼠中进行，针对大鼠和人类，尤其是成熟个体的研究较少，而疾病的治疗多是针对成体进行。本研究在成年大鼠中进行，旨在建立稳定、高效的 MDSCs 的分离和培养方法，为进一步研究奠定基础。成年动物的 MDSCs 含量相对较少，常用的消化酶对细胞损伤较大，消化分离后杂质细胞较多。本研究通过消化法获取 MDSCs。与常用的消化酶不同，Ⅺ型胶原酶可对纤维结缔组织进行快速、充分消化，使肌肉组织松解，MDSCs 能够充分释放；dispase 是一种温和的细胞分离酶，可明显减轻对细胞的损伤，同时对组织进行充分的离散，提高细胞的数量；0.1% 的低浓度胰酶则将细胞消化分离，同时减少了细胞的损耗。消化分离获得的细胞悬液含有肌细胞、成纤维细胞、内皮细胞、血液细胞等多种细胞成分。本研究对细胞悬液进行密度梯度离心，成功去除了绝大部分血液细胞杂质，减少了培养物中的非目的细胞污染，提高了差速贴壁技术的效率。通过上述方法，本研究获得了纯度 >95% 的 MDSCs，为其在疾病治疗中的进一步应用打下了良好基础。

干细胞的鉴定需要从两方面进行：一方面是分化能力的鉴定；另一方面是表达特异性细胞标志，主要为特异性蛋白或特异性表面蛋白谱。本研究观察到 MDSCs 经分化培养后形成肌管，并通过 skeletal myosin (fast) 抗体免疫细胞化学染色鉴定，验证了 MDSCs 的分化能力。目前对于 MDSCs 表达的特异性细胞标志尚无公认的金标准。目前认为只有干细胞抗原-1 (Sca-1) 可以稳定的用来鉴定 MDSCs，CD34 也是常用的鉴定标志[11,16]；另外值得注意的是 MDSCs 缺乏造血干细胞标志物的表达，如 CD45[12,17]。本研究使用肌肉特异性的结蛋白 (desmin) 来鉴定 MDSCs 的肌源性，阳性率 >90%；通过 Sca-1 和 CD34 的阳性表达，鉴定了 MDSCs 的干细胞特异性标志；而通过 CD45 的阴性表达，将 MDSCs 与造血干细胞进行了区分。我们认为，Sca-1、CD34、CD45 和 desmin 组成的鉴定系统，可以作为一种鉴定 MDSCs 的可靠方法。

通过对常规技术的改良，本研究建立了一种稳定高效的成年大鼠 MDSCs 分离技术，并成功对 MDSCs 进行了鉴定，为 MDSCs 在基因治疗和组织工程的临床应用打下了基础。

**参考文献：**


[1] TORRENTE Y, TREMBLAY J P, PISATI F, *et al*. Intraarterial injection of muscle-derived CD34$^+$Sca-1$^+$ stem cells restores dystrophin in mdx mice[J]. J Cell Biol, 2001, 152(2): 335-348.

[2] TORRENTE Y, CAMIRAND G, PISATI F, *et al*. Identification of a putative pathway for the muscle homing of stem cells in a muscular dystrophy model[J]. J Cell Biol, 2003, 162(3): 511-520.

[3] Murry C E, Wiseman R W, Schwartz S M, *et al*. Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis[J]. J Clin Invest, 1996, 98(11): 2512-2523.

[4] QU Z, BALKIR L, VAN-DEUTEKOM J C, *et al*. Development of approaches to improve cell survival in myoblast transfer therapy[J]. J Cell Biol, 1998, 142(5): 1257-1267.

[5] Deasy B M, Huard J. Gene therapy and tissue engineering based on muscle-derived stem cells[J]. Curr Opin Mol Ther, 2002, 4(4): 382-389.

[6] Mauro A. Satellite cells of skeletal muscle fibers[J]. J Biochem Biophys Cytol, 1961, 9: 493-495.

[7] PATE D W, SOUTHERLAND B S, GRANDE D A, *et al*. Isolation and differentiation of mesenchymal stem cells from rabbit muscle[J]. Clin Res, 1993, 41: 374A.

[8] YOUNG H E, CEBALLOS E M, SMITH J C, *et al*. Pluripotent mesenchymal stem cells reside within avian connective tissue matrices[J]. *In Vitro* Cell Dev Biol Anim, 1993, 29A(9): 723-736.

[9] YOUNG H E, CEBALLOS E M, SMITH J C, *et al*. Isolation of embryonic chick myosatellite and pluripotent stem cells[J]. J Tissue Cult Methods, 1993, 14: 85-92.

[10] WILLIAMS J T, SOUTHERLAND S S, SOUZA J, *et al*. Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes[J]. Am Surg, 1999, 65(1): 22-26.

[11] GUSSONI E, SONEKA Y, STRICKLAND C D, *et al*. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation[J]. Nature, 1999, 401(6751): 390-394.

[12] HWANG J H, YUK S H, LEE J H, *et al*. Isolation of muscle derived stem cells from rat and its smooth muscle differentiation[J]. Mol Cell, 2004, 17(1): 57-61.

[13] ALESSANDRI G, PAGANO S, BEZ A, *et al*. Isolation and culture of human muscle-derived stem cells able to differentiate into myogenic and neurogenic cell lineages[J]. Lancet, 2004, 364(9448): 1872-1883.

[14] 李 洪，肖颖彬. 成年大鼠心室肌细胞的分离、培养与鉴定[J]. 第三军医大学学报，2004，26(7)：644-646.

[15] 付春景，郭龙辉，申 琦，等. 心肌肥大和心力衰竭大鼠心肌细胞凋亡及 Bax 和 Bcl-2 的表达[J]. 郑州大学学报：医学版，2005，40(3)：500-502.

[16] LEE J Y, QU-PETERSON Z. CAO B, *et al*. Clonal isolation of muscle-derived cells capable of enhancing muscle regeneration and bone healing[J]. J Cell Biol, 2000, 150(5): 1085-1100.

[17] YOUNG, H E, STEELE T A, BRAY R A, *et al*. Human pluripotent and progenitor cells display cell surface cluster differentiation markers CD10, CD13, CD56, and MHC class-I[J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1999, 221(1): 63-71.


（编辑 张大春）